

**No title available.**

Patent Number: DE4130545  
Publication date: 1993-03-18  
Inventor(s): BAYLINK DAVID J PROF (US)  
Applicant(s):: EWERS ROLF (AT); KIRSCH AXEL (DE); BAYLINK DAVID J (US)  
Requested Patent: ☐ DE4130545  
Application Number: DE19914130545 19910913  
Priority Number(s): DE19914130545 19910913  
IPC Classification: A61F2/28 ; A61L27/00  
EC Classification: A61L24/00H2, A61K38/17A2, A61L24/04M, A61L24/10F, A61K38/18, A61K38/18C,  
A61K38/30  
Equivalents: AU2584192, ☐ EP0558727 (WO9305808), B1, JP6503357T, ☐ WO9305808

**Abstract**

The invention concerns a bone-growth-stimulating composition containing at least one substance selected from the group comprising the growth factors FGF, TGF- beta , IGF-II and PDGF and biologically active mutants and fragments thereof, plus at least one salt selected from the group comprising physiologically tolerated vanadates, molybdates and fluorides, except for the combination IGF-II and fluoride. The invention also concerns the use of such compositions.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Off nl gungsschrift  
10 DE 41 30 545 A 1

51 Int. Cl. 5:  
A 61 L 27/00  
A 61 F 2/28

21 Aktenzeichen: P 41 30 545.0  
22 Anmeldetag: 13. 9. 91  
43 Offenlegungstag: 18. 3. 93

DE 41 30 545 A 1

71 Anmelder:

Baylink, David J., Prof., Loma Linda, Calif., US;  
Ewers, Rolf, Prof. Dr. Dr., Wien, AT; Kirsch, Axel, Dr.,  
7024 Filderstadt, DE

74 Vertreter:

Boehmert, A., Dipl.-Ing.; Hoormann, W., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing., 2800 Bremen; Goddar, H., Dipl.-Phys.  
Dr.rer.nat.; Liesegang, R., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.;  
Münzhuber, R., Dipl.-Phys., 8000 München; Winkler,  
A., Dr.rer.nat., 2800 Bremen; Busch, T., Dipl.-Ing.,  
O-7010 Leipzig; Tönhardt, M., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.,  
Pat.-Anwälte, 8000 München; Stahlberg, W.; Kuntze,  
W.; Köcker, L., Dr.; Huth, M., 2800 Bremen;  
Nordemann, W., Prof. Dr.; Vinck, K., Dr.; Hertin, P.,  
Prof. Dr.; vom Brocke, K., Rechtsanwälte, 1000 Berlin

72 Erfinder:

Baylink, David J., Prof., Loma Linda, Calif., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung

57 Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, mit ei-  
nem Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe,  
die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF  
und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben  
besteht, sowie wenigstens einem Salz aus der Gruppe, die  
aus physiologisch verträglichen Vanadaten, Molybdaten und  
Fluoriden besteht, ausgenommen die Kombination aus IGF-II  
und Fluorid, sowie Verwendung derselben.

DE 41 30 545 A 1

Die Erfindung betrifft eine knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, insbesondere zur Verwendung bei der Behandlung von Knochenerkrankungen.

Die Knochenbildung bei Wirbeltieren ist ein dynamischer Prozeß, der die fortlaufende Knochenproduktion und Knochenresorption umfaßt. Knochenheilung erfordert die Vermehrung neuer Osteoblasten, die sich ihrerseits differenzieren und Knochenmatrix synthetisieren. Bei Knochendefekten verwendet man normalerweise autologes Knochen-Pfropfmateriel. Der Nachteil dieses Ansatzes liegt darin, daß autologes Knochenmaterial die Heilung nicht so schnell beschleunigen kann, wie es erwünscht wäre, und daß in einigen Fällen autologes Knochenmaterial nicht verfügbar ist.

Unter den pharmazeutischen Zusammensetzungen, die verwendet worden sind, um Knochenerkrankungen zu behandeln, findet sich Fluorid, von dem gezeigt worden ist, daß es die Knochenbildung in vivo durch einen direkten mitogenen Effekt auf Knochenzellen stimuliert. Die Dichte von Knochenmineral des axialen Skeletts von Patienten, die mit Fluorid behandelt worden sind, steigt an, ebenso wie der Serumspiegel an alkalischer Phosphatase, einem Index für Knochenbildung im Skelett. Signifikante Anstiege in der Dichte der Wirbelsäulenknöchen können nach etwa 12–18 Monaten Fluorid-Therapie beobachtet werden. Die Fluorid-Behandlung ist jedoch nicht bei allen Patienten gleich wirksam, da einige Patienten nur sehr schwach auf Fluorid reagieren und andere überhaupt nicht.

Zusätzlich zur Fluorid-Behandlung gibt es eine Anzahl anderer Techniken, die für den Zuwachs von Knochenmasse vorgeschlagen worden sind, einschließlich der Verwendung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin E und anderen wachstumsfördernden Substanzen, aber diese Behandlungen haben teilweise nur sehr unbestimmte Erfolge gezeigt.

Die europäische Patentanmeldung 02 89 314 offenbart die Verwendung von IGF-II bei der Behandlung von Knochenstörungen. Außerdem ist offenbart, daß die Kombination von IGF-II und Fluorid-Ionen eine unerwartet verstärkte Wirkung auf die Vermehrung der Knochenzellen bewirkt, wobei das Fluorid-Ion die die Osteoblasten stimulierende Wirkung von IGF-II verstärkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine neue Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die zu einer erhöhten Vermehrung und Differenzierung von Knochenzellen führt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe bei einer knochenwachstumsfördernden Zusammensetzung durch einen Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben besteht, sowie wenigstens einem Salz aus der Gruppe, die aus physiologisch verträglichen Vanadaten, Molybdaten und Fluoriden besteht, ausgenommen die Kombination aus IGF-II und Fluorid. Zu unserer eigenen Überraschung konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Kombination aus IGF-II und Fluorid bei der Steigerung der Vermehrung von Knochenzellen wirksam ist, sondern daß jede der vorgenannten Kombinationen aus wenigstens einem der genannten Wachstumsfaktoren (oder einem biologisch aktiven Mutanten oder Fragment derselben) und wenigstens einem der genannten Salze in dieser Hinsicht in wenigstens vergleichbarem Maße wirksam ist.

In einem ersten Versuch, diese Befunde zu erklären, vermuten wir, daß die Verstärkungswirkung von Fluorid-, Vanadat- oder Molybdatverbindungen auf ihrer hemmenden Wirkung auf Phosphotyrosylproteinphosphatase beruht. Dieses Enzym bewirkt die Dephosphorylierung von Phosphoproteinen, induziert von mitogenen Signalen, wodurch diese mitogenen Signale inaktiviert werden. Durch Hemmen dieser Dephosphorylierung verstärkt man dann das mitogene Signal, das vom Wachstumsfaktor erzeugt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die Zusammensetzung in Kombination wenigstens zwei Wachstumsfaktoren, am bevorzugtesten drei, von denen einer oder mehrere fakultativ durch eine biologisch aktive Mutante oder ein entsprechendes Fragment ersetzt sind. Für diese Kombinationen konnte gezeigt werden, daß die Kombination von zwei oder mehr Wachstumsfaktoren (oder entsprechender Mutanten oder Fragmente derselben) nicht nur eine additive Wirkung auf die Vermehrung und Differenzierung von Knochenzellen hat, sondern einen überraschend merkbaren Synergismus schafft.

Vorzugsweise ist das mit dem Vanadat-, Molybdat- oder Fluorid-Ion verknüpfte Kation aus der Gruppe ausgewählt, die aus Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Ammonium besteht, die physiologisch besonders akzeptable Kationen darstellen.

Der Wachstumsfaktor zur Verwendung in einer Zusammensetzung nach der vorliegenden Erfindung kann mit einer Anzahl verschiedener Techniken hergestellt werden.

Erstens schlägt die vorliegenden Erfindung vor, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus natürlichem, vorzugsweise menschlichem Knochenmaterial gewonnen ist, wie z. B. für IGF-II von Mojan et al., Biochem. Biophys. Acta 884, 234 (1986) beschrieben. Alternativ dazu können die Wachstumsfaktoren auch aus Knochenzellen isoliert werden, die in Kultur gezüchtet sind.

Der zweite Weg für die Gewinnung der Wachstumsfaktoren ist die Isolierung aus Serum, einschließlich Human-, Rinder-, Schafs-, Schweine- oder Pferdeserum, unter Verwendung herkömmlicher Techniken.

Die dritte (und möglicherweise letztendlich die bevorzugte) Herstellungsmethode umfaßt jedoch rekombinante DNA-Techniken, d. h. die Gewinnung der Wachstumsfaktoren oder biologisch aktiven Mutanten oder Fragmente derselben als rekombinante Verbindung aus einem gentechnologischen Verfahren. Einige dieser Techniken sind zum Beispiel für IGF-II in oben genannten europäischer Patentanmeldung 02 89 314 beschrieben.

Schließlich kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung noch durch einen Gehalt an einem mitogenen Knochenextrakt gekennzeichnet sein. Die Herstellung eines solchen wirksamen Knochenextrakts, der ein oder mehrere der genannten Wachstumsfaktoren enthält, ist unter Verwendung üblicher Techniken möglich.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung für die Behandlung von Knochenerkrankungen. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung fördert die Wirkung der Wachstumsfaktoren, was zu einer Vermehrung und Differenzierung der Knochenzellen führt. Diese neuen Knochenzellen verwirklichen dann das Ziel, entweder Knochendefekte schnell aufzufüllen oder das Heilen von z. B. unregelmäßigen Brüchen zu fördern, die erfindungsgemäße Zusammensetzung erweist sich dabei

auch bei der Behandlung v n anderen Knochenerkrankungen, wie Osteoporose als besonders wirkungsvoll.

Die Erfindung wird nun an Hand der f lgenden Beispiele noch weiter veranschaulicht.

#### Beispiel 1

Wirkung von TGF- $\beta$  (oder IGF-II) und Vanadat auch die Vermehrung und Differenzierung von menschlichen Knochenzellen

Menschliche Osteosarcomzellen, SaOS, wurden als Schicht auf DMEM aufgebracht, das 1% Kalbsserum enthält. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen serumfreies DMEM ausgetauscht. Am nächsten Tag wurden die Faktoren zugesetzt (d. h. TGF- $\beta$  (oder IGF-II) und Vanadat). Nach 18 Stunden wurde eine Zellvermehrung durch Einbringen von  $^3\text{H}$ -Thymidin festgestellt. Parallele andere Platten wurden einmal mit PBS gespült und die Zellschicht mit 0,01% Triton X-100 extrahiert. Die Extrakte wurden auf Protein und Aktivität von alkalischer Phosphatase hin untersucht. Die Ergebnisse zeigen klar, daß TGF- $\beta$  (und IGF-II) die Wirkung von Vanadat auf die Vermehrung von menschlichen Knochenzellen steigert.

#### Beispiel 2

Wirkung von FGF und Molybdat auf die Vermehrung und Differenzierung von menschlichen Knochenzellen

Die Vorgehensweise dieses Beispiels ist vergleichbar mit Beispiel 1, mit der Ausnahme, daß die entsprechenden anderen Faktoren zugesetzt werden. Wieder werden die Extrakte auf Protein und Aktivität von alkalischer Phosphatase untersucht. Auch bei FGF zeigt sich, daß die Wirkung von Molybdat auf die Vermehrung von menschlichen Knochenzellen gesteigert wird.

#### Beispiel 3

Wirkung von PDGF und Fluorid auf die Vermehrung und Differenzierung von menschlichen Knochenzellen

Die Vorgehensweise dieses Beispiels ist vergleichbar mit Beispiel 1, mit der Ausnahme, daß die entsprechenden anderen Faktoren zugesetzt werden. Auch hier werden die Extrakte wieder auf Protein und Aktivität von alkalischer Phosphatase hin untersucht. Auch PDGF steigert die Wirkung von Fluorid auf die Vermehrung von menschlichen Knochenzellen.

Die in der vorstehenden Beschreibung, sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlichen sein.

#### Patentansprüche

1. Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben besteht, sowie wenigstens einem Salz aus der Gruppe, die aus physiologisch verträglichen Vanadaten, Molybdaten und Fluoriden besteht, ausgenommen die Kombination aus IGF-II

und Fluorid.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kombination wenigstens zwei Wachstumsfaktoren, enthält von denen einer oder beide fakultativ durch eine biologisch aktive Mutante oder ein entsprechendes Fragment ersetzt ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kombination drei Wachstumsfaktoren enthält, von denen einer oder mehrere fakultativ durch eine biologisch aktive Mutante oder ein entsprechendes Fragment ersetzt sind.

4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das mit dem Vanadat-, Molybdat- oder Fluorid-Ion verknüpfte Kation ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Ammonium besteht.

5. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus natürlichem Knochenmaterial gewonnen ist.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus menschlichem Knochenmaterial gewonnen ist.

7. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus Serum, einschließlich Human-, Rinder-, Schafs-, Schweine- oder Pferdeserum, gewonnen ist.

8. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren bzw. eine (eines von deren biologisch aktiven Mutanten oder Fragmenten als rekombinante Verbindung aus einem gentechnologischen Verfahren gewonnen ist.

9. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem mitogenen Knochenextrakt.

10. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur Behandlung von Knochenerkrankungen.

- Leerseite -